

文章编号:1673-1689(2006)03-0007-04

高静水压对产 β -胡萝卜素粘红酵母的诱变效应

王岁楼^{1,2}, 吴晓宗², 郝莉花², 孙君社^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 利用 100~500 MPa 的静水高压和 10~30 min 的保压时间对粘红酵母(*Rh. glutinis* RG5)进行处理,发现处理 10 min 时的高压存活曲线呈现马鞍形,说明高静水压处理的最终效应可能是多种生物学效应的累积。150 MPa 保压 20 min 时的突变株 RG5-3 的生物量虽然比出发菌株 RG5 下降了 9.25%,但目的产物 β -胡萝卜素的质量分数却比 RG5 提高了 68.60%。传代实验表明,该诱变株遗传稳定性良好,没有发生性状退化及回复突变。利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)比较发现,限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 切割的 RG5 和 RG5-3 的 DNA 片段有明显不同,证明高静水压使粘红酵母 RG5 在表面性状和 DNA 水平上都发生了改变。

关键词: 高静水压;粘红酵母;诱变

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Study on Mutagenic Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on β -Carotene Producing *Rhodotorula glutinis*

WANG Sui-lou^{1,2}, WU Xiao-zong², HAO Li-hua², SUN Jun-she^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this paper, the β -carotene producing *Rh. glutinis* RG5 was treated by high hydrostatic pressure (HHP) at 100~500 MPa for 10~30 min. The shape of the survival curve for 10min was saddle, which shows that the result of HHP treatment might be due to was the cumulation of many biology effects. The biomass of mutant RG5-3 (treated at 150 MPa for 20 min) was decreased 9.25% compared with that of the untreated RG5, but the relevant β -carotene content was increased 68.60%. Its genetic quality was also proved to be stable by experiments. The DNA fragments cut by Hind III and BamH I were different, and this result proved that HHP changed *Rh. glutinis* RG5 in both exterior characters and nucleic acid level.

Key words: high hydrostatic pressure (HHP); *Rhodotorula glutinis*; mutation

在生物工程领域,如何进一步提高工业微生物的产量是一个永恒的研究课题。尽管目前许多人

把研究的重点放在基因工程菌的构建改良上,但诱变育种仍在实际生产中占主导地位。现有的物理

收稿日期:2006-03-03; 修回日期:2006-04-20.

基金项目:河南省自然科学基金项目(0411021900);河南省杰出青年基金项目(9902).

作者简介:王岁楼(1961-),男,陕西宝鸡人,教授,食品生物技术博士研究生。

和化学诱变剂一方面由于频繁使用,其诱导新突变的能力下降;另一方面由于它们几乎都有辐射性或毒性,在很大程度上限制了它们的应用。

高静水压(High Hydrostatic Pressure, HHP)处理是一种新的物理技术,压力范围一般在100~1 000 MPa,其在生物学领域主要应用于深海生物、生物物化性质、嗜极菌蛋白质研究等方面,并逐渐形成了一门新的学科——高压生物技术^[1]。在高静水压作用下,大多数微生物能够产生压力诱导蛋白质(PIPs)^[2],或自适应调整细胞膜蛋白的种类和含量^[3],甚至可以引起微生物遗传物质——核酸的改变,如高静水压可导致啤酒酵母产生四倍体^[4],可使得酵母和大肠杆菌的DNA含量大幅度减少^[5],这些都证明高静水压能影响DNA的复制^[6-7]。

目前国内外鲜有高压诱变育种的研究报道^[7]。美国地球物理所发现了一种耐高压的大肠杆菌和一种耐高压的海洋细菌,它们能耐受超过10 000 MPa的压力,相当于海平面大气压力的1.6万倍^[8]。中国高翔等^[9]用220 MPa高静水压处理大肠杆菌TG1、DH5 α 和HB101,得到了耐压的突变菌株TG1P、DH5 α P和HB101P。李桂双等^[10]利用75 MPa高压处理水稻种子,发现其叶片中类胡萝卜素含量明显提高。作者曾用150 MPa高静水压处理漆酶产生菌灵芝(*G. lucidum* Karst)^[11],结果发现酶活提高了282.67%,发酵时间也缩短了1 d。

利用红酵母发酵生产 β -胡萝卜素是一项很有发展前景的微生物技术^[12],但目前所研究和报道的菌株发酵产量普遍较低。为了提高粘红酵母RG5生物合成 β -胡萝卜素的产量,作者对其进行了高静水压诱变研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株 粘红酵母(*Rh. glutinis* RG5),作者所在实验室保藏菌种。

1.1.2 培养基

1)液体种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2,蛋白胨 1,酵母膏 1。自然pH值。

2)摇瓶发酵培养基(组分 g/dL):葡萄糖 4,蛋白胨 0.5,酵母膏 0.5。pH 6.0。

3)完全培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2,蛋白胨 2,酵母膏 1,琼脂 2。pH 6.0。

4)二苯胺初筛培养基:将二苯胺溶解后,分别以50~500 μ g/L的不同浓度添加到完全培养基

中,制成不同浓度的二苯胺平板。

1.2 方法

1.2.1 诱变前预处理 取活化后的菌株两环接种至盛有50 mL种子培养液的250 mL三角瓶中,28℃振荡(150 r/min)预培养24 h,再分别取0.5 mL预培养种子液接种于40瓶盛30 mL种子培养液的250 mL三角瓶中。28℃振荡(150 r/min)培养,比浊法测定菌体浓度,使细胞数达到 $10^6 \sim 10^7$,生长处于对数生长期。将该种子液混合摇匀,取1 000 mL在4 000 r/min下离心,用无菌生理盐水洗涤,再次离心。将离心过的酵母细胞悬浮于1 000 mL浓度为40 mmol/L的Tris-HCl缓冲液中(pH值为7.30),分装到高温灭菌过的聚丙烯袋中。

1.2.2 高压处理 采用800-15L型超高压设备,其最高压力为800 MPa,最大容积为15 L,传压方式为外部加压,加压、保压、卸压均为自动控制。

按预定方案选取压力与保压时间做双因素全面试验,每个条件做3个平行,以分装好但未进行高压处理的出发菌株作为对照。将样品分装袋放入装水的聚丙烯袋内,封口后放入超高压处理设备内,进行高静水压处理,恒温 (25 ± 2) ℃。

1.2.3 突变株筛选 将处理后的样品在完全培养基中培养24 h后离心,以无菌生理盐水稀释呈浓度梯度,涂布于二苯胺初筛培养基上,置于28℃下培养48 h,挑选生长并变红的菌落。

1.2.4 生物量测定及 β -胡萝卜素的抽提 按文献^[12]的方法进行。

1.2.5 β -胡萝卜素的HPLC测定 Waters 600高效液相色谱仪(美国Waters公司制造),其主要测定条件如下:色谱柱:RP-CDS C18分离柱(Hypersil公司,250×4.6 mm),柱温30℃,流动相:乙腈:二氯甲烷:甲醇(80:10:10)。 β -胡萝卜素丙酮抽提液5 mL在N₂保护下吹干称重后,用甲醇:二氯甲烷(1:1)溶解,定容至5 mL进行测定。进样流速0.8 mL/min,进样量20 μ L,检测波长450 nm,对照 β -胡萝卜素标准样以峰面积积分法定量。

1.2.6 限制性片段长度多态性分析(RFLP) 分别提取出发菌株RG5和 β -胡萝卜素产量最高的高压突变株RG5-3的DNA^[13]。以纯化后DNA作为底物进行酶切处理,用Hind III, EcoR I, BamH I, Hae III(华美生物工程公司产品)分别处理,反应按照酶切说明书进行,1 g/dL琼脂糖凝胶进行电泳,电压70 V,电泳时间1.5 h。溴化乙啶染色,拍照。

2 结 果

2.1 高静水压处理存活曲线

图 1 是 *Rh. glutinis* RG5 高静水压处理存活曲线。从图 1 可以发现,高静水压处理与一般诱变剂的处理结果有一些不同,即存活曲线呈马鞍形。

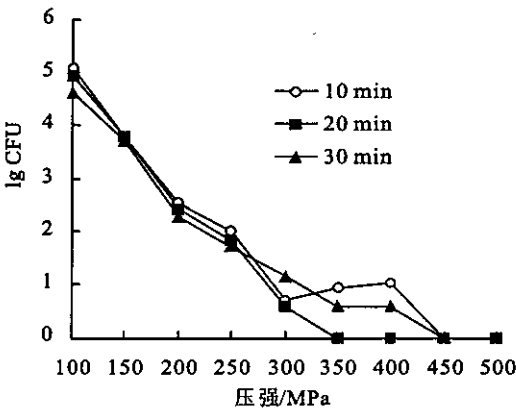


图 1 静水高压处理粘红酵母 RG5 的存活曲线

Fig. 1 Survival curve of *Rh. glutinis* RG5 treated by HHP

在 100~300 MPa 之间,*Rh. glutinis* RG5 菌株存活率几乎成直线下降,但在 300 MPa 下处理 30 min 的存活率反而要比处理 10 min 和 20 min 高一些,在 350 MPa 下处理 20 min 的存活率(以 lg CFU 计)为 0,而处理 30 min 的存活率却为 0.602。对于处理 10 min 的 RG5 来说,在 300 MPa 其存活率为 0.699,而在 350 MPa 存活率又可达到 0.954,400 MPa 存活率为 1.041。

大量的研究结果证明^[14-16],存活曲线呈马鞍型的低能离子诱变对微生物细胞的损伤是非正常损伤,即其诱变效应是多种生物效应,如质量沉积、溅射刻蚀、电荷交换等效应的累积。因此,高静水压诱变是否也为多种生物效应的累积,值得我们从理论和实验方面去探索。

Elke Y. 等^[17]对细菌在高压均质和高静水压下的失活进行了研究,发现 *E. coli* LMM1010 突变株在高压均质处理过程中存活时间只有 1 s,而在高静水压下存活时间长达 15 min。其原因可能是高压均质的压力作用目标是细胞壁,微生物细胞受到的主要是诸如压力突然变化、剪切、碰撞、空穴、湍流等一些物理效应,而在高静水压下,压力分散作用于多个目标,一些生物效应得到充分的积累和释放,只有在一定数量的作用目标失活后,细胞才会死亡。但高静水压究竟产生哪些生物效应还需具体研究。

2.2 二苯胺初筛培养基的选择

由于二苯胺可以抑制代谢途径中八氢番茄红

素下游的类胡萝卜素合成,使粘红酵母的菌落颜色变浅以致失去原有的红色,更高的浓度甚至可以抑制菌落生长。因此,选择合适浓度的二苯胺添加到完全培养基作为粘红酵母诱变育种的初筛培养基。

将出发菌株接种到不同浓度的平板上,28 ℃ 培养 48 h,菌落生长和显色情况见表 1,最终选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 的二苯胺培养基作为初筛培养基。

表 1 粘红酵母 RG5 在二苯胺平板上的生长情况和颜色变化

Tab. 1 The growth and colonies' color of <i>Rh. glutinis</i> RG5 on diphenylamine panels		
二苯胺浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	生长情况	颜色变化
0	++++	++++
50	++++	+++
100	++++	++
150	++++	++
200	++++	+
250	++	+
300	++	+
350	+	+
400	—	—
450	—	—
500	—	—

2.3 突变株的筛选及遗传稳定性检验

根据二苯胺培养基上菌落的大小、颜色深浅,挑选出同一处理条件下 2~5 个菌落较大、颜色较红者进行发酵培养,测定生物量及 β -胡萝卜素产量。不同诱变条件下产量最高的 5 株突变菌的发酵结果见表 2。

表 2 突变株的 β -胡萝卜素产量

Tab. 2 The β -carotene production of mutants					
菌株	诱变条件		生物量/ (g/L)	β -胡萝卜素 质量分数 ($\mu\text{g/g}$)	β -胡萝卜素 产量/ (mg/L)
	压力/ MPa	时间/ min			
RG5	0	0	19.272	326.888	6.300
RG5-1	100	30	17.886	365.700	6.541
RG5-3	150	20	17.490	551.138	9.639
RG5-4	150	30	21.802	313.375	6.832
RG5-8	300	10	19.382	351.325	6.809
RG5-9	300	30	18.722	399.913	7.487

从表 2 可知, RG5-4 生物量比出发菌株 RG5 提高了 13.13%,RG5-8 的生物量也有一定提高,但

幅度不大。RG5-1, RG5-3, RG5-8, RG5-9 的 β -胡萝卜素含量和产量都比出发菌株有一定的提高,但各菌株提高幅度差别较大,其中 RG5-3 提高幅度最大(β -胡萝卜素含量和产量分别提高了 68.60% 和 53%),再次是 RG5-9(β -胡萝卜素含量和产量分别提高了 22.34% 和 18.84%)。

对 RG5-3 和 RG5-9 连续传 5 代,并测定其第 3、5 代 β -胡萝卜素产量,结果见表 3。从表 3 可知,这两株突变株的遗传稳定性良好,没有发生性状退化及回复突变。这说明高静水压处理作为一种菌种诱变的新方法是可行的。

表 3 突变株传代后第 3、5 代的 β -胡萝卜素产量
Tab. 3 The β -carotene production of the mutants after 3rd and 5th generation

菌株	代数	生物量/ (g/L)	β -胡萝卜素 质量分数/ (μ g/g)	β -胡萝卜素 产量/ (mg/L)
RG5-3	0	17.490	551.138	9.639
	3	17.422	550.253	9.587
	5	17.431	549.832	9.584
RG5-9	0	18.722	399.913	7.487
	3	18.720	398.787	7.465
	5	18.712	397.955	7.447

2.4 RFLP 结果

为了从核酸水平上证实 *Rh. glutinis* RG5 高静水压处理后发生变异,利用 4 种核酸内切酶对 RG5、RG5-3 的 DNA 进行酶切处理,结果见图 2。

从图 2 可以看出,用 Hind III 处理后,突变株的 DNA 片段比对照要多出 3 段;用 BamH I 处理后,突变株 DNA 比对照明显多出 1 个片段。这说明高静水压处理 *Rh. glutinis* RG5,不仅使其菌落颜色、 β -胡萝卜素产量等表面性状发生变化,其 DNA 分子也发生了改变,证实了高静水压诱变微生物的可行性。

3 讨 论

在高静水压下,微生物细胞的受压环境相当重要,其中压力的影响至为关键。在较低压力条件下,细胞仅仅是被迫激活膜物质合成基因以克服细

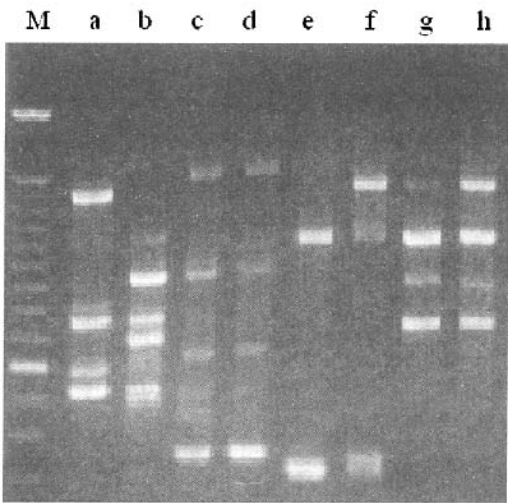


图 2 凝胶电泳图谱 (Hind III 处理 RG5 (a) 和 RG5-3 (b), EcoR I 处理 RG5 (c) 和 RG5-3 (d), BamH I 处理 RG5 (e) 和 RG5-3 (f), Hae III 处理 RG5 (g) 和 RG5-3 (h))

Fig. 2 Gel electrophoresis of Hind III restriction digests

胞膜结构受到的影响;而较高的压力还诱导一些未知的基因和酶产生,这些诱导物主要消除高压所造成的更为不利的影响,如降解变性蛋白质等。因此在一定程度上,可以认为高静水压的生物效应就是微生物细胞对自身在该条件下的修复响应。

其次为温度,在研究高静水压对微生物的影响时,必须将其纳入压力—温度体系进行考察研究。压力和温度这两个重要的物理参数,在某些热力学特性上非常相似。因此,当对压力影响机制不太了解的情况下,可让压力套用温度模型,再反过来验证修改压力模型。

再次为水环境,微生物细胞必须在水环境中才能均匀地受到压力作用,但水不只是充当介质和保护作用。水分子在压力下可以渗透到天然蛋白质分子内部并改变蛋白质的构象,使其折叠或展开,从而失去原来特有的三级结构,成为一种特殊的中间态。这种构象在压力诱导解链变性的 Arc 阻遏子中已得到了证实^[18]。

pH 值、菌龄、培养基成分、升卸压速度等也都是影响微生物高静水压诱变的重要因素^[19]。总之,高静水压对微生物的影响非常复杂,其诱变机理及影响因素仍有待深入研究。

参考文献:

[1] Bartlett D H. Pressure effects on in vivo microbial processes[J]. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2002, 1995:367—381.
[2] Van Bogelen R A, Neidhardt F C. Ribosome as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:5589—5593.
万方数据

参考文献：

[1] 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京:化学工业出版社.

[2] Kayashita J, Shimaoka I, Nakajyoh M. Hypocholesterolemic effect of buckwheat protein extract in rats fed cholesterol enriched diets[J]. **Nutrition Research**, 1995,15(5): 691—698.

[3] Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M,et al. Feeding of buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rats[J]. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 1996,7(10): 555—559.

[4] 李刚. 生物化学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2001. 10.

[5] 无锡轻工业学院,天津轻工业学院. 食品分析[M]. 北京:北京轻工业出版社,1983.

[6] Marion M B. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248—254.

[7] 时钧. 袁权. 膜技术手册[M]. 北京:化学工业出版社.

[8] 张超,郭贯新,张晖. 苦荞麦可溶性蛋白质提取工艺以及性质的研究[J],食品工业科技,2004(4):72—75.

[9] 张志诚,黄夫照,朱柏华. 超滤技术研究与应[M]. 北京:海洋出版社,

[10] Sirkar K K, Lloyd D R. New membrane materials & process for separation[M]. [s.l.]:Aiche Publisher, 1998.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 10 页)

[3] Chi E, Bartlet D H. Use of a reporter gene to follow high pressure signal transduction in the deep sea bacterium photo bacterium SS9[J]. **Bacteriol**, 1993, 175: 7533—7540.

[4] Bartlett D H, Kato C, Horikoshi K. High pressure influences on gene and protein expression[J]. **Res Microbiol**, 1995, 146:697—706.

[5] Abe F, Horikoshi K. Tryptophan permeates gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Mol Cell Biol**, 2000, 20: 8098—8102.

[6] 王岁楼,吴晓宗,郝莉花,等. 超高压在工业微生物诱变育种中的应用初探[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(6):7—9.

[7] 王岁楼,吴晓宗,郝莉花,等. (超)高压对微生物的影响及其诱变效应探讨[J]. 微生物学报,2005,45(6):164—167.

[8] 柯为. 嗜极生物中的嗜高压生物[J]. 生物工程学报,2002,18(4):515.

[9] 高翔,李炯,阮康成,等. 高压力诱变的耐压大肠杆菌[J]. 生物化学与生物物理学报,2001, 33(1):77—81.

[10] 李桂双,白成科,段俊,等. 静水高压处理对水稻植株生理特性的影响[J]. 高压物理学报,2003,17(2):122—128.

[11] 王岁楼,李国富,王琼波,等. 紫外和超高压诱导漆酶产生菌变异的对比研究[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2005,20(3):39—42.

[12] 王岁楼. 红酵母类胡萝卜素高产菌株筛选及其发酵生理学条件研究[J]. 工业微生物,2001,31(1): 19—22.

[13] Barszczewski W, Robak M. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques[J]. **Food Microbiology**, 2004, 21:227—231.

[14] 袁成凌,余增亮. 低能重离子生物学研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2004,22(1):1—7.

[15] Wu L, Yu Z L. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat[J]. **Radiation and Environmental Biophysics**, 2001, 40(7):53—57.

[16] 吕树娟,王军,姚建铭,等. 离子注入氧化葡萄糖酸杆菌的诱变效应[J]. 激光生物学报,2003,12(5):382—385.

[17] Elke Y, Chris W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2001, 64:333—341.

[18] Pascale M, Gaston H B H. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of acromolecules and macromolecule-associated water[J]. **International Review of Cytology**, 2001, 201:1—84.

[19] Jan P P M, Johan C, Patrick C, et al. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2002, 78:57—77.

(责任编辑:李春丽)